

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790727

研究課題名(和文) ヒト大腸がん幹細胞の継代培養系における腫瘍形成能維持のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of maintaining the stemness properties in human colon cancer stem cells using innovative spheroid culture system

研究代表者

大畑 広和 (Ohata, Hirokazu)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：40570057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：近年、がん組織の一部に存在するがん幹細胞が、がんの発生や治療抵抗性、再発に深く寄与すると考えられている。本研究により、ヒト大腸がん手術検体よりがん幹細胞の特性を有する細胞の簡便かつ安定的な継代培養法を確立した。その為、我々が樹立した大腸がん幹細胞の培養法に基づき、がん幹細胞の生物学的特性を解明することは、革新的ながん治療法の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been proposed that cancer stem cells (CSCs) are responsible for tumor formation, therapeutic resistance and recurrence. We established the in vitro spheroid culture of CSCs from human colon cancer surgical specimens. Therefore, through our analysis of the mechanism of maintaining the stemness properties in human colon CSCs, we aimed to link our study to the development of innovative cancer therapies.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：がん幹細胞 CD44 大腸がん

## 1. 研究開始当初の背景

種々のがんにおいて、がんの発生や治療抵抗性、およびがんの再発に深く寄与する「がん幹細胞」の存在がクローズアップされ始めていた。大腸がんにおいては、2007年のDick JEらとDe Maria Rらの2つのグループによるヒト大腸がん幹細胞の同定に始まり、幾つかのグループで特異的細胞表面マーカー(CD44やCD133など)に対する抗体を使った大腸がん幹細胞の同定及び解析が行われていた。しかしながら、ヒト原発がんより同定した大腸がん幹細胞を増殖させ、*in vitro*で安定な継代培養を行った例は、殆ど報告されていなかった。その為、大腸がん幹細胞の継代培養系を確立できれば、その生物学的特性の解析や革新的ながんの治療法開発など様々な面で非常に有用であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、(1)ヒト大腸がん検体より大腸がん幹細胞の特性を有する細胞の継代培養が可能となるスフェロイド培養法を確立する事、(2)ヒト大腸がん幹細胞における「幹細胞性」の維持、及び「CD44発現制御」のメカニズムを解明する事を目的とし、腫瘍形成能維持機構の制御に基づく新たな大腸がん治療戦略の開発を目指すものである。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト大腸がん幹細胞の培養法

国立がん研究センター中央病院の協力の下、患者の同意を得た上で、ヒト大腸がん手術検体を入手した。検体を酵素処理後、改変したES細胞用の無血清培地を用いて浮遊状態により、大腸がん幹細胞の培養を行った。また、大腸がん幹細胞を血清存在下、接着状態で培養することにより、分化を誘導した。

### (2) ウェスタンブロット法、リアルタイムPCR法

種々のタンパク質に対する抗体を用いてウェスタンブロットを行った。また、各種遺伝子に対するTaqmanプローブを用いてリアルタイムPCRを行い、各種遺伝子の発現を調べた。

### (3) 免疫不全マウスを用いた腫瘍形成試験

細胞解離剤 Accutase で単一細胞にした大腸がん細胞を免疫不全マウス(NOD-Scid マウス)の皮下に移植し、腫瘍形成能を調べた。採取した腫瘍はヘマトキシリン・エオジン染色(H&E染色)を行った。

### (4) スフェロイド形成能試験

細胞解離剤 Accutase で単一細胞にした大腸がん細胞を CD44 に対する抗体で染色後、フローサイトメトリーにより CD44 陽性細胞と CD44 陰性細胞を分取し、スフェロイド形成能を比較した。

また、大腸がん幹細胞マーカーCD44の機能を阻害する中和抗体を用いて、スフェロイド形成に対する影響を調べた。また、レンチウイルス発現ベクターを用いて CD44 に対する shRNA を作製し、CD44 の発現を抑制した場合のスフェロイド形成に対する影響も検証した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト大腸がん幹細胞のスフェロイド形成による継代培養系の確立

ヒト大腸がん手術検体を酵素処理後、Rho kinase 阻害剤を添加した ES 細胞用の無血清培地を使用する事により、スフェロイド形成細胞の *in vitro* での安定な継代培養に成功した(図1)。

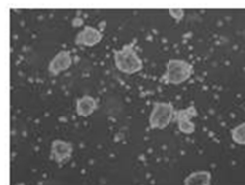


図1 スフェロイド細胞

### (2) スフェロイド形成細胞が有する幹細胞性の検証

我々が樹立したスフェロイド形成細胞が「がん幹細胞」としての特性を有する細胞であるかを、ウェスタンブロット、リアルタイムPCR等の方法により検証した。

その結果、スフェロイド形成細胞が大腸がん幹細胞のマーカーである CD44 を発現する細胞を含んでいること、Nanog 等の幹細胞に特有な遺伝子を発現していること、血清存在下で CD44 陰性の上皮細胞様の細胞に分化すること(図2)、免疫不全マウスに皮下移植すると、病理学的に原発大腸がんとは区別できない腫瘍を形成すること(図3)等を見出した。

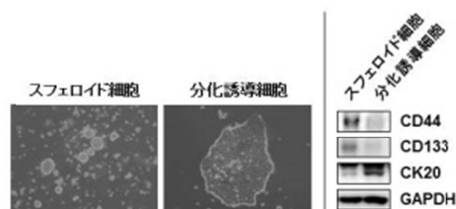


図2 スフェロイド細胞と分化誘導細胞の形態とウェスタンブロットによる大腸がん幹細胞マーカー(CD44, CD133)と分化細胞マーカー(CK20)の発現比較

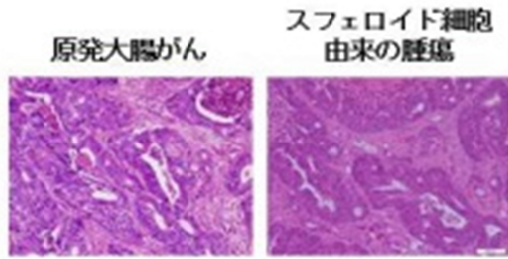


図3 H&E染色像

(3) 幹細胞性維持における CD44 の役割

がん幹細胞における「幹細胞性」がそのスフェロイド形成能と相関している事は良く知られている。我々が確立した大腸がん幹細胞を酵素処理によって細胞を解離後、フローサイトメトリーにより、CD44 陽性細胞と CD44 陰性細胞を分取し、スフェロイド形成を比較した。その結果、CD44 陰性細胞に比べて、CD44 陽性細胞の方が顕著にスフェロイド形成能の高い事が明らかとなった(図4)。

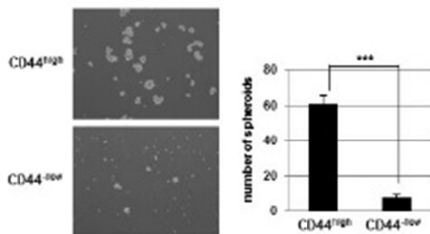


図4 CD44陽性細胞とCD44陰性細胞のスフェロイド形成能の比較

また、CD44 の機能を抑制する抗体や RNAi 法を用いた CD44 の発現抑制によって、スフェロイド形成が顕著に抑制されることを見出していた(図5)。この事は、スフェロイド形成に CD44 が機能的に重要であり、大腸がんにおいては CD44 陽性細胞が「がん幹細胞」の特性を有する細胞であることを強く支持するものである。

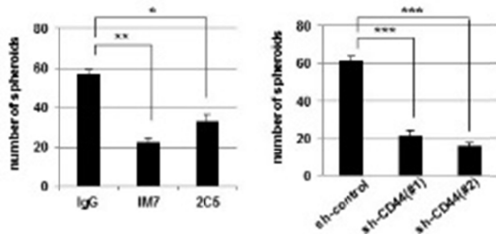


図5 中和抗体(左)とshRNA(右)によるCD44の機能阻害がスフェロイド形成を抑制する

(4) 大腸がん幹細胞における CD44 発現制御機構の解析

上記の結果より、我々は Rho kinase 阻害剤(Y-27632)を用いることにより、ヒト大腸がん検体より、大腸がん幹細胞の継代培養に

成功した。また、大腸がん幹細胞マーカである CD44 がスフェロイド形成に重要であり、CD44 陽性細胞が大腸がん幹細胞としての特性を有していることを明らかとなった。非常に興味深いことに、Rho kinase 阻害剤が大腸がん幹細胞マーカ CD44 の発現をタンパク質レベルで顕著に上昇させることを見出した(図6)。

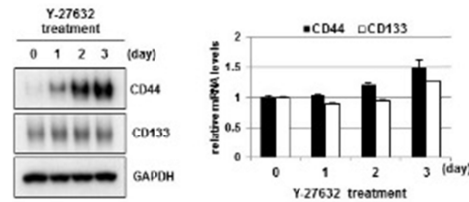


図6 Rho kinase阻害剤(Y-27632)は大腸がん幹細胞マーカCD44のタンパク質レベルでの発現を誘導する

現在は、Rho kinase 阻害剤による CD44 発現制御メカニズムの解析を進めている。マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析やいくつかの特異的阻害剤を用いた実験により、Akt-mTOR シグナル経路が重要である事がわかってきている。

本研究において、我々は Rho kinase 阻害剤を使用することにより、ヒト大腸がん手術検体由来の大腸がん幹細胞を簡便かつ安定的に継代培養する方法を世界で初めて確立し、Cancer Research 誌に論文発表した。この培養法により樹立したスフェロイド細胞は、自己複製能や分化能といったがん幹細胞としての特性を有していることも確認している。この培養方法は、大腸がん以外のがん種にも適用できる可能性があり、今後のがん研究の発展に貢献できると考えられる。また、がん幹細胞はがんの発生やがん治療抵抗性、がんの再発・転移に深く関与していると考えられている。その為、我々が樹立したがん幹細胞を用いて、その生物学的な特性を詳細に検証することにより、がん予防や画期的かつ革新的ながん治療の開発に発展することが大いに期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hirokazu Ohata, Tatsuya Ishiguro, Yuki Aihara, Ai Sato, Hiroaki Sakai, Shigeki Sekine, Hirokazu Taniguchi, Takayuki Akasu, Shin Fujita, Hitoshi Nakagama, Koji Okamoto

「Induction of the stem-like cell regulator CD44 by Rho kinase inhibition contributes to the maintenance of colon-initiating cells」  
Cancer Research, vol.72, pp.5101-5110, 2012, 査読有  
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3812

〔学会発表〕(計 2 件)

大畑 広和、中釜 斉、岡本 康司  
「大腸がん幹細胞における Akt-mTOR 経路  
を介した CD44 の発現制御機構」  
第 7 2 回 日本癌学会学術総会、2 0 1 3  
年 1 0 月 (横浜)

大畑 広和、石黒 竜也、中釜 斉、岡  
本 康司  
「ROCK 阻害剤は CD44 の発現誘導を介して  
大腸がん幹細胞の増殖を促進する」  
第 7 1 回 日本癌学会学術総会、2 0 1 2  
年 9 月 (札幌)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

大畑 広和 (OHATA, Hirokazu)  
独立行政法人 国立がん研究センター・研  
究所・発がんシステム研究分野・研究員  
研究者番号 : 4 0 5 7 0 0 5 7